

REC'D 15 APR 2003

WIPO PCT

PCT/KR 03/005380

0 / KR 25.03.2003
Rec'd PCT/PTO 24 SEP 2004 #2



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0064308
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 10월 21일
Date of Application OCT 21, 2002

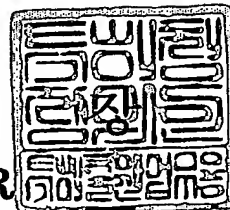
출원인 : 주식회사 바이오시너젠
Applicant(s) BioSynergen, Inc.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 03 월 25 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

| | |
|------------|---|
| 【서류명】 | 특허출원서 |
| 【권리구분】 | 특허 |
| 【수신처】 | 특허청장 |
| 【제출일자】 | 2002.10.21 |
| 【발명의 명칭】 | 라이소포스파티딜콜린 또는 그 유사체를 포함하는 패혈증 예방 및 치료용 조성물 |
| 【발명의 영문명칭】 | COMPOSITION FOR PREVENTING AND TREATING SEPSIS COMPRISING LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE OR ITS DERIVATIVES |
| 【출원인】 | |
| 【명칭】 | 주식회사 바이오시너젠 |
| 【출원인코드】 | 1-2000-030433-5 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 김윤배 |
| 【대리인코드】 | 9-1998-000024-4 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-018468-8 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 이범일 |
| 【대리인코드】 | 9-1998-000310-6 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-018469-5 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 이세진 |
| 【대리인코드】 | 9-1998-000312-9 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-018470-8 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 조영신 |
| 【대리인코드】 | 9-1999-000332-8 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-018471-5 |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 김영희 |
| 【성명의 영문표기】 | KIM, Yung Hi |
| 【주민등록번호】 | 361004-2670414 |
| 【우편번호】 | 200-959 |

| | | | |
|------------|--|----------|--|
| 【주소】 | 강원도 춘천시 후평1동 845번지 현대1차아파트 103동 404호 | | |
| 【국적】 | KR | | |
| 【발명자】 | | | |
| 【성명의 국문표기】 | 송동근 | | |
| 【성명의 영문표기】 | SONG,Dong Keun | | |
| 【주민등록번호】 | 561029-1670415 | | |
| 【우편번호】 | 200-163 | | |
| 【주소】 | 강원도 춘천시 후평3동 동아아파트 101동 403호 | | |
| 【국적】 | KR | | |
| 【발명자】 | | | |
| 【성명의 국문표기】 | 서홍원 | | |
| 【성명의 영문표기】 | SUH,Hong Won | | |
| 【주민등록번호】 | 570304-1067011 | | |
| 【우편번호】 | 200-963 | | |
| 【주소】 | 강원도 춘천시 후평3동 동아아파트 101동 205호 | | |
| 【국적】 | KR | | |
| 【발명자】 | | | |
| 【성명의 국문표기】 | 허성오 | | |
| 【성명의 영문표기】 | HUH,Sung Oh | | |
| 【주민등록번호】 | 610801-1030615 | | |
| 【우편번호】 | 200-180 | | |
| 【주소】 | 강원도 춘천시 석사동 석사대우아파트 108동 101호 | | |
| 【국적】 | KR | | |
| 【공개형태】 | 간행물 발표 | | |
| 【공개일자】 | 2002. 10. 14 | | |
| 【취지】 | 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 배 (인) 대리인 이범일 (인) 대리인 이세진 (인) 대리인 조영신 (인) | | |
| 【수수료】 | | | |
| 【기본출원료】 | 17 면 | 29,000 원 | |
| 【가산출원료】 | 0 면 | 0 원 | |

| | | | | |
|-----------|---|---|---|---|
| 【우선권주장료】 | 0 | 건 | 0 | 원 |
| 【심사청구료】 | 0 | 항 | 0 | 원 |
| 【합계】 | 29,000 | 원 | | |
| 【감면사유】 | 소기업 (70%감면) | | | |
| 【감면후 수수료】 | 8,700 | 원 | | |
| 【첨부서류】 | 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.소기업임을 증명하는 서류[사본—사업자등록증, 벤처기업확인서,원 천징수이행상황신고서, 임대차 계약서]_4통 3.공지예외적용대상(신규성상실의예외, 출원시의특례)규정을 적용받 기 위한 증명서류_1통 | | | |

【요약서】

【요약】

본 발명은 패혈증 예방 및 치료 효과가 우수한 약제학적 조성물에 관한 것으로, 유효성분으로서 라이소포스파티딜콜린 및 그 유사체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

【대표도】

도 1a

【색인어】

라이소포스파티딜콜린

【명세서】**【발명의 명칭】**

라이소포스파티딜콜린 또는 그 유사체를 포함하는 패혈증 예방 및 치료용 조성물
{COMPOSITION FOR PREVENTING AND TREATING SEPSIS COMPRISING LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE OR ITS DERIVATIVES}

【도면의 간단한 설명】

도 1a 내지 도 1d는 CLP 패혈증 모델에서 라이소포스파티딜콜린의 효과를 도시한다.

도 2a 및 도 2b는 세균(*E. coli*)-유발 패혈증 모델에서 라이소포스파티딜콜린의 효과를 도시한다.

도 3은 LPS-유발 패혈증 모델에서 라이소포스파티딜콜린의 효과를 도시한다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <4> 본 발명은 라이소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 또는 그 유사체를 포함하는 패혈증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.
- <5> 패혈증(sepsis)은 세균의 침입에 대해 숙주가 과도하게 전신적 반응을 함으로써 생기며, 이로 인한 사망률이 약 45%에 이른다. 대부분의 경우 세균에 감염된 숙주가 그람 음성균의 내독소(endotoxin)에 대해 과도하게 반응함으로써 발생한다. 패혈증을 치료하

기 위해 항균제와 스테로이드 제제가 사용되고 있으나 그 효과가 미미하여 패혈증으로 인한 사망률이 여전히 높은 실정이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<6> 따라서, 본 발명의 목적은 패혈증의 예방 및 치료 효과가 우수한 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

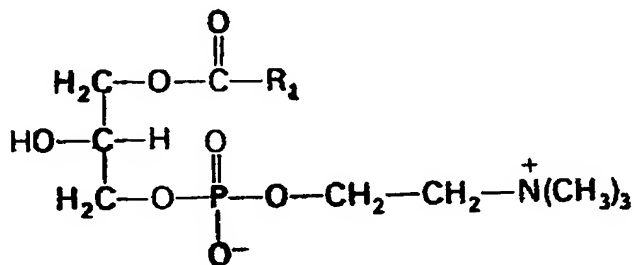
【발명의 구성 및 작용】

<7> 상기 목적에 따라, 본 발명에서는 유효성분으로서 라이소포스파티딜콜린 또는 그 유도체를 포함하는 패혈증 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

<8> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<9> 본 발명에서 유효성분으로 사용되는 라이소포스파티딜콜린은 하기 화학식 1로 표시된다:

<10> 【화학식 1】

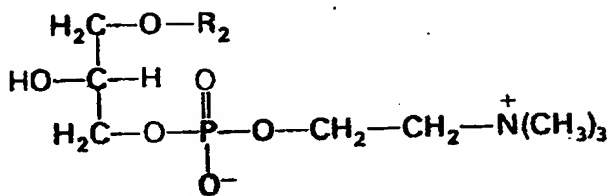


<11> 상기 식에서, R_1 은 C_{4-30} 의 알킬이거나 하나 또는 그 이상의 이중결합을 지닌 C_{4-30} 의 알케닐이다. 바람직한 라이소포스파티딜콜린은 1-스테아오일(18:0) 라이소포스파티딜콜린 ($\text{L}-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, stearyl; Lysolecithin, stearoyl), 1-올레오일(18:1) 라이소포스파티딜콜린 ($\text{L}-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, Oleoyl;

Lysolecithin, oleoyl), 및 1-미리스토일(14:0) 라이소파티딜콜린 ($L-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, myristoyl)이다.

<12> 또한, 본 발명에서 유효성분은 라이소포스파티딜콜린의 유사체일 수 있고, 바람직하게는 하기 화학식 2의 라이소포스파티딜콜린의 에테르 유사체일 수 있다:

<13> 【화학식 2】



<14> 상기 식에서 R_2 는 C_4 -30의 알킬이거나 하나 또는 그 이상의 이중결합을 지닌 C_4 -30의 알케닐이다. 바람직하게는 라이소포스파티딜콜린, 0-알크-1-에닐 ($L-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, γ -O-Alk-1-Enyl; Lysophosphatidylcholine); 라이소포스파티딜콜린, 0-알킬 ($L-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, γ -O-Alkyl; Lyso-platelet activating factor); 라이소포스파티딜콜린, 0-헥사데실 ($\text{DL}-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, γ -O-Hexadecyl; rac-Lyso-platelet activating factor); 및 라이소포스파티딜콜린, 0-헥사데실 ($L-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, γ -O-Hexadecyl; Lyso-platelet activating factor; Lyso-PAF- C_{16})이다.

<15> 라이소포스파티딜콜린 및 그 유사체는 상업적으로 용이하게 입수할 수 있다. 또한, 라이소포스파티딜콜린 및 그 유사체는 동물로부터 분리할 수 있고, 당업계에 잘 알려진 합성 방법으로 제조될 수도 있다.

- <16> 라이소포스파티딜콜린 및 그 유사체는 포유동물의 체내에 내재성 물질이므로 안전성은 입증된 것과 다름없다.
- <17> 본 발명의 약제학적 조성물은 다양한 비경구 또는 경구 투여 형태로 제형화 할 수 있다. 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 또한, 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 캡셀제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예 : 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/ 또는 글리신), 활탁제(예 : 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/ 또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- <18> 본 발명의 약제학적 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 제제화할 수 있다.
- <19> 본 발명의 조성물의 유효성분으로서 라이소포스파티딜콜린 및 그 유사체는 인간을 포함하는 포유동물에 대해 하루에 0.01 내지 100 mg/kg(체중)의 양으로 1일 1회 또는 분할하여 비경구 또는 경구적 경로를 통해 투여할 수 있다.

<20> 이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<21> 참고예 1: 패혈증 모델

<22> (a) 맹장 결찰 및 천공 (Cecal Ligation and Puncture; CLP) 패혈증 모델

<23> ICR 마우스 (체중 25 내지 30g; MJ Ltd.)를 펜토바비탈로 마취시킨 후, 복부 오른쪽 부위를 1cm 길이로 절개하고 맹장을 노출시킨 다음 회맹부 관 (ileocecal valve) 아래 부위를 결찰한 후 맹장에 21 게이지 바늘로 4개의 구멍을 내고, 복부를 다시 봉합하여 패혈증을 유발하였다.

<24> (b) 직접적으로 유발시킨 패혈증 모델

<25> ICR 마우스 (체중 25 내지 30g; MJ Ltd.)에 10^8 개의 살아있는 *E. coli*(DH5a)를 함유하는 세균 현탁액을 0.5ml의 용량으로 복강내 주사하여 패혈증을 유발하였다 (세균-유발 패혈증 모델).

<26> 또한, ICR 마우스 (체중 25 내지 30g; MJ Ltd.)에 리포폴리사카라이드(LPS; *E. coli* 055:B5에서 유래된)를 5mg/kg으로 복강내 주사하여 패혈증을 유발하였다 (LPS-유발 패혈증 모델).

<27> 실시예 1: CLP 패혈증 모델에서 라이소포스파티딜콜린의 효과

<28> 실시예 1a

<29> 참고예 1(a)에 따른 CLP 패혈증 모델의 ICR 마우스 40마리를 봉합한 지 2 시간 후부터 12시간 간격으로 4회에 걸쳐, 각 10마리의 ICR 마우스에게는 1 회씩 지방산이 없는 1% BSA(bovine serum albumin) 용액에 녹인 $L-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린, 스테아로일 (Sigma)을 5, 10, 20mg/kg의 양으로 복강 투여하고 (실험군), 나머지 10마리의 ICR 마우스에게는 지방산이 없는 1% BSA 용액 만을 투여하였다 (대조군). 시간이 경과함에 따른 실험군 및 대조군의 ICR 마우스의 생존율을 조사하였고 그 결과는 도 1a에 도시하였다. 도 1a에서 알 수 있듯이, 라이소포스파티딜콜린을 투여한 실험군의 마우스들은 대조군의 마우스들에 비하여 생존율이 훨씬 높았다.

<30> 실시에 1b

<31> 라이소포스파티딜콜린이 패혈증이 진행된 경우에도 효과가 있는지를 관찰하기 위하여, 참고예 1(a)에 따른 CLP 패혈증 모델의 ICR 마우스 20마리를 CLP후 10시간 후부터 12시간 간격으로 4회에 걸쳐, 10마리의 ICR 마우스에게는 1 회씩 지방산이 없는 1% BSA 용액에 녹인 $L-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린, 스테아로일 (Sigma)을 10mg/kg의 양으로 복강 투여하고 (실험군), 나머지 10마리의 ICR 마우스에게는 지방산이 없는 1% BSA 용액 만을 투여한 (대조군) 후에, 시간이 경과함에 따른 실험군 및 대조군의 ICR 마우스의 생존율을 조사하였고, 그 결과는 도 1b에 도시하였다. 도 1b에서 알 수 있듯이, 패혈증이 더 진행된 경우에도 라이소포스파티딜콜린은 거의 동일한 치료효과를 유지하였다.

<32> 실시에 1c

<33> 1-스테아로일 라이소포스파티딜콜린과 아실기 (화학식 1의 R_1 기)가 상이한 라이소포스파티딜콜린도 패혈증에 효과가 있는지를 알아보기 위하여, 1-스테아로일 라이소포스

파티딜콜린 대신에 각각 1-올레오일(18:1) 라이소포스파티딜콜린 및 1-미리스토일(14:0) 라이소포스파티딜콜린을 10mg/kg의 양으로 복강 투여하는 것을 제외하고는 실시예 1a와 동일한 방식으로 시험하였고, 그 결과를 도 1c에 도시하였다. 도 1c에서 알 수 있듯이, 1-스테아로일 라이소포스파티딜콜린과 아실기가 상이한, 1-올레일(18:1) 라이소포스파티딜콜린 및 1-미리스토일(14:0) 라이소포스파티딜콜린도 패혈증에 대해 우수한 치료효과를 나타냈다.

<34> 실시예 1d

<35> 참고예 1(a)에 따른 CLP 패혈증 모델의 ICR 마우스 20마리를 CLP후 2 시간 및 12시간에, 10마리의 ICR 마우스에게는 지방산이 없는 1% BSA 용액에 녹인 L- α -라이소포스파티딜콜린, 스테아로일 (Sigma)을 10mg/kg의 양으로 복강 투여하고 (실험군), 나머지 10마리의 ICR 마우스에게는 지방산이 없는 1% BSA 용액 만을 투여하였다 (대조군). 이들 마우스들을 CLP 24시간 후에 마취시킨 후, 복강을 노출시킨 뒤에 각각의 멸균 생리식염수(2ml) 세척액을 취하여 다시 멸균 생리식염수로 1/1000으로 희석한 후, 각각의 희석액을 10 μ l씩 Trypticase Soy 아가(BD BBL 사, USA) 플레이트상에 도말한 뒤, 37℃에서 하룻밤 배양하여 콜로니의 수(Colony Forming Unit(CFU))를 측정하여, 그 평균값을 도 1d에 나타내었다. 도 1d에 도시된 바와 같이, 라이소포스파티딜콜린이 투여된 실험군의 마우스들에서는 대조군과 비교하여 복강내 세균의 수가 80%까지 감소되었다.

<36> 실시예 2: 대장균-유발 패혈증 모델에서 라이소포스파티딜콜린의 효과

<37> 실시예 2a

<38> 참고예 1(b)에 따른 대장균-유발 패혈증 모델의 ICR 마우스 20마리를 대장균 주사 2시간 후부터 12시간 간격으로 4회에 걸쳐, 10마리의 ICR 마우스에게는 지방산이 없는 1% BSA용액에 녹인 $L-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린, 스테아로일 (Sigma)을 10mg/kg의 양으로 복강 투여하고 (실험군), 나머지 10마리의 ICR 마우스에게는 지방산이 없는 1% BSA 용액만을 투여하였다 (대조군). 시간이 경과함에 따른 실험군 및 대조군의 ICR 마우스의 생존율을 조사하였고 그 결과를 도 2a에 도시하였다. 도 2a에서 알 수 있듯이, 라이소포스파티딜콜린을 투여한 실험군의 마우스들은 대조군의 마우스들에 비하여 생존율이 훨씬 높았다.

<39> 실시예 1b

<40> 참고예 1(b)에 따른 세균-유발 패혈증 모델의 ICR 마우스 20마리를 봉합한 후, 2시간 및 12시간에 10마리의 ICR 마우스에게는 지방산이 없는 1% BSA 용액에 녹인 $L-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린, 스테아로일 (Sigma)을 10mg/kg의 양으로 복강 투여하고 (실험군), 나머지 10마리의 ICR 마우스에게는 지방산이 없는 1% BSA 용액만을 투여하였다 (대조군). 그리고 나서 실시예 1d에서와 같이, 이들 마우스들의 복강액내의 세균 수(CFU)를 측정하여, 그 결과를 도 2b에 나타내었다. 도 2b에 도시된 바와 같이, 라이소포스파티딜콜린이 투여된 실험군의 마우스들에서는 대조군과 비교하여 복강내 세균의 수가 현격히 감소되었다.

<41> 실시예 3: LPS-유발 패혈증 모델에서 라이소포스파티딜콜린의 효과

<42> 참고예 1(b)에 따른 LPS-유발 패혈증 모델의 ICR 마우스 20마리를 대장균 주사 2시간 후부터 12시간 간격으로 4회에 걸쳐, 10마리의 ICR 마우스에게는 지방산이 없는 1% BSA용액에 녹인 $L-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린, 스테아로일 (Sigma)을 10mg/kg의 양으로 복강 투여하고 (실험군), 나머지 10마리의 ICR 마우스에게는 지방산이 없는 1% BSA 용액만을 투여하였다 (대조군). 시간이 경과함에 따른 실험군 및 대조군의 ICR 마우스의 생존율을 조사하였고 그 결과를 도 3에 도시하였다. 도 3에서 알 수 있듯이, 라이소포스파티딜콜린을 투여한 실험군의 마우스들은 대조군의 마우스들에 비하여 생존율이 훨씬 높았다.

<43> 실시예 1~3의 결과로 부터 라이소포스파티딜콜린 및 그 유사체는 패혈증의 예방 및 치료 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

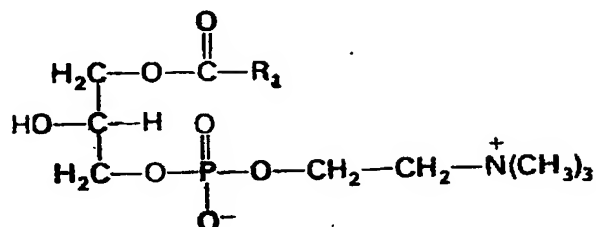
【발명의 효과】

<44> 유효성분으로서 라이소포스파티딜콜린 또는 그 유도체를 함유하는 본 발명의 조성물은 패혈증을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

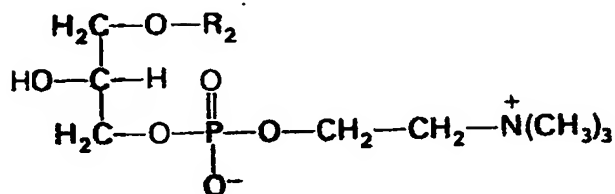
유효성분으로서 하기 화학식 1로 표시되는 라이소포스파티딜콜린 및 그것의 유사체를 포함하는 패혈증의 예방 및 치료용 조성물:

화학식 1

상기 식에서, R₁은 C₄₋₃₀의 알킬이거나 하나 또는 그 이상의 이중결합을 지닌 C₄₋₃₀의 알케닐이다.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 유도체는 하기 화학식 2로 표시되는 라이소포스파티딜콜린의 에테르 유사체인 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 및 치료용 조성물:

화학식 2

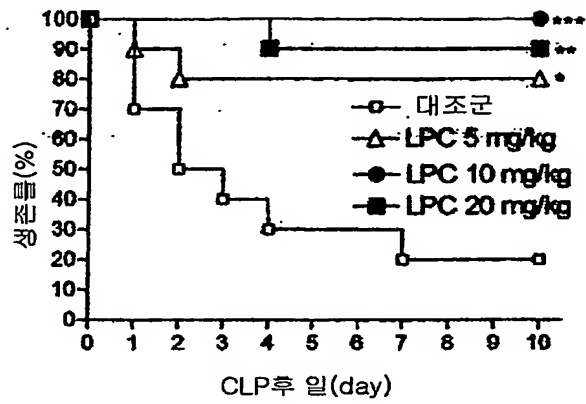
상기 식에서, R₂는 C₄₋₃₀의 알킬이거나 하나 또는 그 이상의 이중결합을 지닌 C₄₋₃₀의 알케닐이다.

【청구항 3】

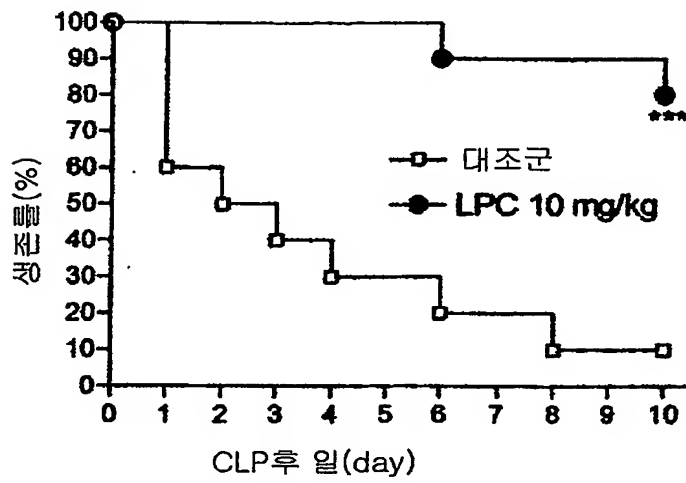
제 1항에 있어서, 상기 라이소포스파티딜콜린은 1-스테아로일 라이소포스파티딜콜린, 1-올레오일 라이소포스파티딜콜린, 및 1-미리스토일 라이소포스파티딜콜린으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 및 치료용 조성물.

【도면】

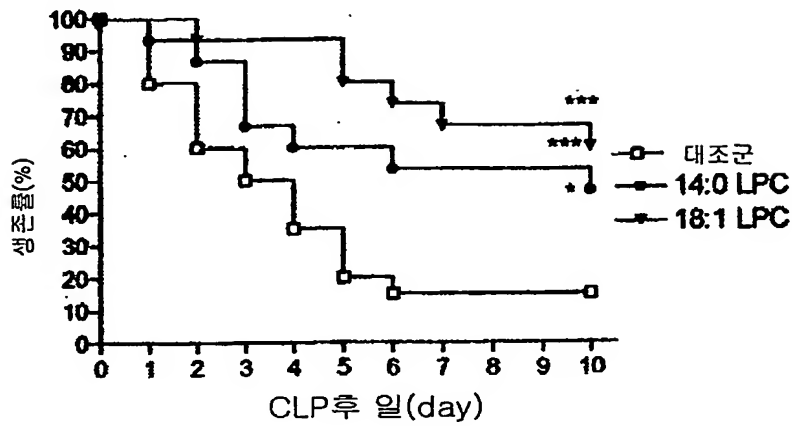
【도 1a】



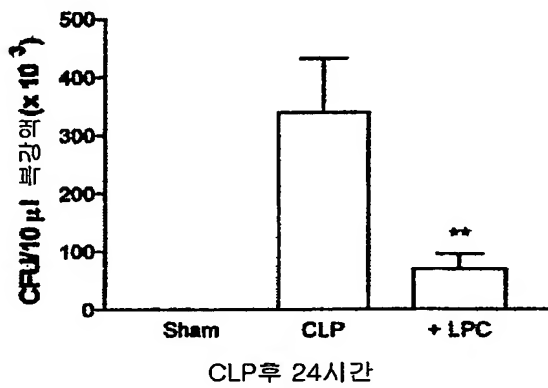
【도 1b】



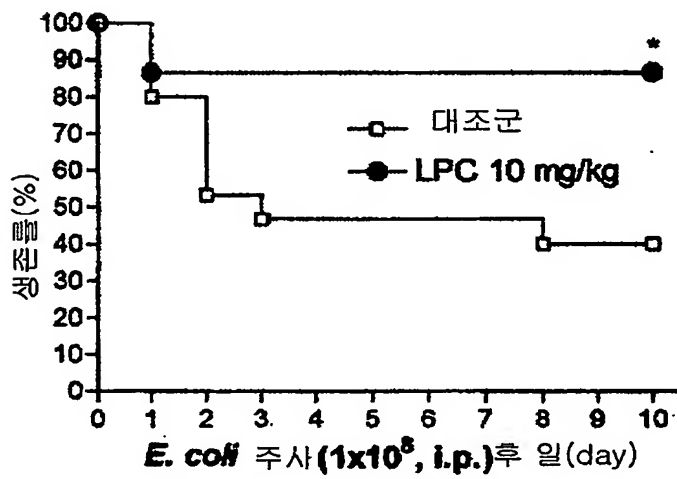
【도 1c】



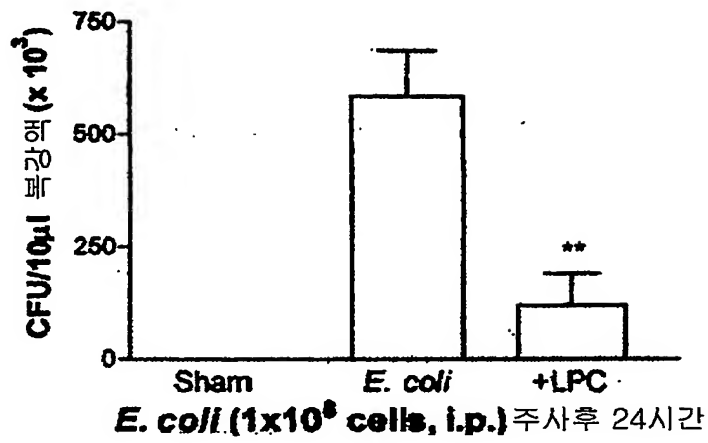
【도 1d】



【도 2a】



【도 2b】



【도 3】

